

说明书摘要

增强蛋白类疫苗免疫效果的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸

本发明提供了数种含 CpG 单链脱氧寡核苷酸,特别是可增强 狂犬疫苗、乙型肝炎疫苗、流感病毒疫苗和其它蛋白类疫苗免疫效果的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸; 这些含 CpG 的单链脱氧寡核苷酸和狂犬疫苗、乙型肝炎疫苗、流感病毒疫苗和其它蛋白类疫苗的生物制剂; 以及这些含 CpG 单链脱氧寡核苷酸用于制备可增强狂犬疫苗、乙型肝炎疫苗、流感病毒疫苗和其它蛋白类疫苗免疫效果的生物制剂的用途。

CpG-containing single-stranded oligodeoxynucleotides that enhance the efficacy of protein vaccine

The invention provides several CpG-containing single-stranded oligodeoxynucleotides (ODNs) which can enhance the efficacy of vaccines including Rabies vaccine, Type B Hepatitis vaccine, influenza vaccines and other protein vaccines. The invention provides the composition containing CpG-containing single-stranded oligodeoxynucleotides (ODNs), Rabies vaccine, Type B Hepatitis vaccine, influenza vaccine and other protein vaccine. The invention also provides the usages of the CpG-containing single-stranded oligodeoxynucleotides (ODNs) that enhance the efficacy of Rabies vaccine, Type B Hepatitis vaccine, influenza vaccines and other protein vaccines.

权 利 要 求 书

- 1、 含 CpG 单链脱氧核苷酸，它们由含一个或多个 CpG 的寡核苷酸单链
5 DNA 分子构成。
- 2、 按照权利要求 1 所述的含 CpG 单链脱氧核苷酸，它们的磷酸二酯键
可以是非硫化的，部分硫化的也可以是完全硫化的。
- 3、 按照权利要求 1 所述的含 CpG 单链脱氧核苷酸，它们具有 SEQ ID
NO: 1-81 所示的序列。
- 10 4、 按照权利要求 1-3 中任一项所述的含 CpG 单链脱氧核苷酸用于制备
用于刺激人外周单个核细胞的分化增殖的药物的用途。
- 5、 按照权利要求 1-3 中任一项所述的含 CpG 单链脱氧核苷酸用于制备
用于刺激人外周单个核细胞表达 CD19 的药物的用途。
- 6、 按照权利要求 1-3 中任一项所述的含 CpG 单链脱氧核苷酸用于制备
15 用于刺激外周血单个核细胞产生肿瘤坏死因子的药物的用途。
- 7、 按照权利要求 1-3 中任一项所述的含 CpG 单链脱氧核苷酸用于制备
用于刺激外周血单个核细胞产生 IL-6 的药物的用途。
- 8、 按照权利要求 1-3 中任一项所述的含 CpG 单链脱氧核苷酸用于制备
可增强狂犬疫苗免疫效果的生物制剂的用途。
- 20 9、 按照权利要求 1-3 中任一项所述的含 CpG 单链脱氧核苷酸用于制备
可增强乙型肝炎疫苗免疫效果的生物制剂的用途。
- 10、 按照权利要求 1-3 中任一项所述的含 CpG 单链脱氧核苷酸用于制备
可增强流感病毒疫苗免疫效果的生物制剂的用途。

增强蛋白类疫苗免疫效果的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸

5

发明领域

本发明涉及数种含 CpG 单链脱氧寡核苷酸，特别是涉及可增强狂犬疫苗、乙型肝炎疫苗、流感病毒疫苗和其它蛋白类疫苗免疫效果的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸；以及这些含 CpG 单链脱氧寡核苷酸用于制备可增强
10 狂犬疫苗、乙型肝炎疫苗、流感病毒疫苗和其它蛋白类疫苗免疫效果的生物制剂的用途。

发明背景

100 多年前，Coley 在世界上第一个开展了应用细菌提取物治疗细菌感染性疾病的实验，他得出结论：细菌的提取物是一种可以用于治疗传染性疾病的制剂。
15

1984 年，Tokunaga T 等发现从卡介苗（BCG）提取的 DNA 能抑制多种动物肿瘤的生长，具有激活人外周血单个核细胞和小鼠脾脏天然杀伤（NK）细胞的活性，诱导干扰素（IFN）的产生。非脊椎动物的 DNAs 有
20 上述功能，脊椎动物和植物的 DNA 则不然，这些功能依赖于 DNA 分子中 CpG 结构 (Tokunaga T, Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from Mycobacterium bovis BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity, JNCI, 72:955. 1984)。

CpG 是由胞嘧啶和鸟嘌呤通过磷酸连接成的二核苷酸。C 代表胞嘧啶，G 代表鸟嘌呤，p 代表磷酸，胞嘧啶位于 5'端。多种具有 CpG 结构的细菌和病毒 DNA 对脊椎动物的免疫系统均为危险的信号，可激活多种免疫细胞启动对细菌和病毒的抵抗机制。近年来的研究表明，人工合成的含一个或多个 CpG 的寡核苷酸单链 DNA (CpG ODN) 也可表现强效的免疫增强和免疫调节作用。CpG ODN 可强力增强 B 细胞、T 细胞、NK 细胞、抗原提呈细胞（单核细胞、巨噬细胞和树突状细胞）和中性粒细胞
30

的功能，表现出明显的临床应用前景(Weiner GJ, The immunobiology and clinical potential of immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides. J Leukoc Biol 2000 Oct; 68(4):455-63)。

5 由于序列，尤其是 CpG 两侧的序列的不同，CpG ODN 可有多种多样的形式，表现不同性质、不同强度的免疫增强和免疫调节作用。CpG ODN 可表现出种属依赖性，即对一种动物表现免疫增强功能的 CpG ODN，在另一种动物或人则未必表现出同样的或等效的免疫增强功能(Kamstrup S, et al. Response of porcine peripheral blood mononuclear cells to CpG-containing oligodeoxynucleotides, Vet Microbiol 2001 Feb 26; 78(4)352-62; 10 Gunther Hartmann, et al. Delineation of a CpG Phosphorothioate Oligodeoxynucleotide for Activating Primate Immune Responses In Vitro and In Vivo The Journal of Immunology, 2000, 164: 1617-1624)。

研究表明，某些 CpG ODN 有强效的免疫增强作用，可增强 B 细胞、T 细胞、NK 细胞、抗原提呈细胞（单核细胞、巨噬细胞和树突状细胞）
15 和中性粒细胞的功能，表现出明显的临床应用价值(Weiner GJ, The immunobiology and clinical potential of immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides. J Leukoc Biol 2000 Oct; 68(4):455-63)。Cynthia L. 等证明，CpG ODN 可明显增强重组乙型肝炎表面抗原（HBsAg）的免疫效果（Cynthia L. et al. CpG DNA can induce strong Th1 humoral and cell-mediated
20 immune responses against hepatitis B surface antigen in young mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 95, 26, 15553-15558, December 22, 1998）。与 HBsAg 单独免疫相比，HBsAg 和 CpG ODN 一起免疫 BALB/c 小鼠可使其抗 HBsAg 抗体的滴度增加 5- 到 40-倍(Gunther Hartmann, et al. Delineation of a CpG Phosphorothioate Oligodeoxynucleotide for Activating Primate Immune
25 Responses In Vitro and In Vivo The Journal of Immunology, 2000, 164: 1617-1624)。

此外，CpG ODN 可明显增强狂犬疫苗，流感嗜血杆菌疫苗，白喉-百日咳-破伤风疫苗以及其他蛋白类疫苗诸如呼吸道合胞病毒（RSV）疫苗，口蹄疫病毒（foot-and-mouth disease virus）疫苗，免疫缺陷病毒疫苗（HIV gp120）等许多疫苗的免疫效果，CpG ODN 可明显增强外周
30

血中单个核细胞增生以及表达 CD19，促进 TNF 以及 IL-6 的表达。

发明内容

发明概述

5 本发明的目的之一是提供数种含 CpG 单链脱氧寡核苷酸，特别是可增强狂犬疫苗、乙型肝炎疫苗、流感疫苗和其它蛋白类疫苗免疫效果的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸。它们由含一个或多个 CpG 的寡核苷酸单链 DNA 分子构成，其磷酸二酯键可以是部分硫化的，全部硫化的，也可以是未硫化的。

10 优选地，本发明的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸具有 SEQ ID NO: 1-81 所示的序列。

 本发明的目的之二是提供含有本发明的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸和狂犬疫苗、乙型肝炎疫苗、流感病毒疫苗和其它蛋白类疫苗的生物制剂。较之于普通的狂犬疫苗、乙型肝炎疫苗、流感疫苗和其它蛋白类疫苗，
15 这些生物制剂的免疫效果有了明显的提高。

 本发明的目的之三是提供本发明的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸用于制备可增强狂犬疫苗、乙型肝炎疫苗、流感病毒疫苗和其它蛋白类疫苗免疫效果的生物制剂的用途。

 另外，需要指出的是，在本申请的上下文的公开内容的基础上，本
20 发明的其它具有实质性特点的方面和创造性的有益效果对本领域的普通技术人员来说是可以直接推知的。

附图简要说明

 图1显示了CpG刺激外周血单个核细胞(48h)产生CD19的实验结果。

25 图2显示了CpG刺激外周血单个核细胞产生IL-6的实验结果。

具体实施方式

 在本发明的上下文中，所使用的术语除非另外说明，一般具有本领域的普通技术人员通常理解的含义。

30 本发明的数种含 CpG 单链脱氧寡核苷酸，特别是可增强狂犬疫苗、

乙型肝炎疫苗、流感疫苗和其它蛋白类疫苗免疫效果的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸由含一个或多个 CpG 的寡核苷酸单链 DNA 分子构成，其磷酸二酯键可以是部分硫化的，全部硫化的，也可以是未硫化的。优选地，本发明的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸具有如下所示的序列：

- 5 101 5'-TcGTCgAgggCgCCggTgAC-3'
- 102 5'-TCgTCgCCggTgggggTgTg-3'
- 103 5'-TCgTCgTACgCAATTgTCTT-3'
- 104 5'-TCgCCTCgTCgCCTTCgAgC-3'
- 201 5'-TCgCCCACCggTgggggggg-3'
- 10 202 5'-TCgTCgCAgACCggTCTgggg-3'
- 203 5'-gggggACgTCgCCggggggg-3'
- 204 5'-ggATCCgTACgCATgggggg-3'
- 205 5'-TCgTCgCggCCggCgCCCC-3'
- 206 5'-TCgTCgCggCCgCgAggggg-3'
- 15 301 5'-TCgTCgTTACCgATgACgTCgCCgT-3'
- 302 5'-TCgTCgggTgCgACgTCgCAgggggg-3'
- 303 5'-TCgTCgggTgCgACgATCgTCgggggg-3'
- 304 5'-TCgTCgTTTgCATCgATgCAgTCgTCgTT-3'
- 305 5'-TCgTCgTTTgCATCgATgCAggggggg-3'
- 20 306 5'-ACCggTATCgATgCCggTgggggg-3'
- 307 5'-ggggTCCATgACgTTCCTgAAgggggg-3'
- 308 5'-TCgTCgTTTTgACgATCgTCgggggg-3'
- 309 5'-TTCgTCgTTTgATCgATgTTCgTTgggggg-3'
- 310 5'-TTCgTCgTTgTgATCgATgggggg-3'
- 25 311 5'-TATCgATgTTTTcGTCgTCgTTgggggg-3'
- 312 5'-TTCgTTgCATCgATgCATcGTTgggggg-3'
- 313 5'-TTCgCTTCgCTTTTCgCTTCgCTT-3'
- 601 5'-TCgAggACAAgATTCTCgTgC-3'
- 602 5'-TCgAggACAAgATTCTCgTgCAggCC-3'
- 30 603 5'-TCgTgCAggCCAACgAggCCg-3'

- 604 5'-ACCGCCAAggAgAAgCCgCAggAggg-3'
- 605 5'-TCgTTgCCgTCggCCC-3'
- 606 5'-TACAACggCgAggAATACC-3'
- 607 5'-TCggCACgCgACgTgCTggCCgTCgTTTCC-3'
- 5 608 5'-gTACAACggCgAggAATACCT-3'
- 609 5'-ACCGTCgTTgCCgTCggCCC-3'
- 610 5'-TgCTggCCgTCgTT-3'
- 611 5'-gTCggCACgCgACg-3'
- 612 5'-gTCggCACgCgACggggggg-3'
- 10 613 5'-gTCggCACgCgACgCCCCC-3'
- 614 5'-TCgTTgCCgTCggCCCCCCCC-3'
- 615 5'-TCgTTgCCgTCggCCCCC-3'
- 616 5'-TCgTTgCCgTCggCCCC-3'
- 617 5'-TCgTTgCCgTCggCCCC-3'
- 15 618 5'-TCgTTgCCgTCggCCCCC-3'
- 619 5'-TCgTTgCCgTCgg-3'
- 620 5'-TCgTTgCCgTCggg-3'
- 621 5'-TCgTTgCCgTCgggg-3'
- 622 5'-TCgTTgCCgTCggggg-3'
- 20 623 5'-TCgTTgCCgTCgggggg-3'
- 624 5'-TCgTTgCCgTCggggggg-3'
- 625 5'-TCgTTgCCgTCgggggggg-3'
- 626 5'-TCgTTgCCgTCggggggggg-3'
- 627 5'-TCgAggACAAGATTCTCgT-3'
- 25 628 5'-TCCCgCTggACgTT-3'
- 629 5'-TCggCACgCgACgTgCTggCCgTCgTT-3'
- 631 5'-TCgTCgCgCCgTCACggggggg-3'
- 632 5'-TCgTgTgCgTgCCgTTggg-3'
- 633 5'-TCgTCgCCgTTgggCggg-3'
- 30 634 5'-TCgTCgACgTCgTTgggCggg-3'

- 635 5'-TCgCAgTTgTCgTAACgTTgggCggg-3'
 636 5'-TTACCggTTAACgTTggCCggCC-3'
 637 5'-ACCggTTAACgTTgTCCCCgggg-3'
 638 5'-TCgTCgTTggTATgTT-3'
 5 639 5'-TCgTCgTCgTCgTTgTCgTT -3'
 640 5'-TCgTCgTCgTCgTTgTCgTTgggg-3'
 641 5'-TCgTTCggggTgCCg-3'
 642 5'-TCgTTCggggTAACgATT-3'
 643 5'-TCgTTCggggTAACgTT-3'
 10 644 5'-TCgTTCggggTACCgAT -3'
 645 5'-TCgTTCggggTACCgATgggg-3'
 646 5'-TCgTTgCgCTCCCATgCCggggggg-3'
 647 5'-TCgTCgTTTCgTCgTTgggg-3'
 648 5'-TCgTTgTCgTTTCgCTgCCggCggggg-3'
 15 649 5'-CgTTgACgATCgTCCCATggCggg-3'
 650 5'-TCTgCggCCTTCgTCg-3'
 651 5'-TAgTAACCggTCCggCgCCCC-3'
 652 5'-TTgCAgCgCTgCCggTggg-3'
 653 5'-TCgTACggCCgCCgTACggCggg-3'
 20 654 5'-CggCCCATCgAgggCgACggC-3'
 655 5'-TCgCgTCgACTCCCCTCgAgggg-3'
 656 5'-TCgTCgTCgACTCgTggTCggggg-3'
 657 5'-TCgggCgCCgATCgggggg-3'
 658 5'-TCgTCggTCTTTCgAAATT-3'
 25 659 5'-TCgTgACgTCCTCgAgTT-3'

以上所述的序列可以是部分硫化的，全部硫化的，也可以是未硫化的。

本发明的CpG单链脱氧核苷酸可通过已知的方法生产，例如采用固相亚磷酰胺三酯法进行生产。以下的实施例详细地例举了一种生产本发明的CpG单链脱氧核苷酸的方法。

- 30 在这些含CpG单链脱氧寡核苷酸用于制备可增强狂犬疫苗、乙型肝炎疫苗、流感病毒疫苗和其它蛋白类疫苗免疫效果的生物制剂的用途中，

含CpG单链脱氧寡核苷酸与狂犬疫苗、乙型肝炎疫苗、流感病毒疫苗和其它蛋白类疫苗的使用量的比例为1:1-100:1(摩尔比)。

5 本发明的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸的使用方式包括与常规蛋白类疫苗、DNA 疫苗混合使用,与常用的佐剂(如铝佐剂、弗氏佐剂等)联合应用来增强疫苗免疫效果、与常规蛋白类疫苗通过交联剂共价偶联使用;

免疫方式包括皮下应用、粘膜表面应用、肌肉应用、胃肠应用、腹腔应用等常用的免疫方式。

CpG 单链脱氧寡核苷酸使用时间可为常规疫苗免疫前应用、与常规疫苗同时应用、常规疫苗免疫后应用。

10 在小鼠试验中 CpG 单链脱氧寡核苷酸的使用量为 1-500 微克/小鼠,如进行人体试验则按标准的换算方法进行换算。

下面结合具体的制备实施例和生物学效果实施例,并参照附图进一步详细地描述本发明。应理解,这些实施例只是为了举例说明本发明,而非以任何方式限制本发明的范围。

15

实施例

在如下实施例中,未详细描述的各种过程和方法是本领域中公知的常规方法,例如合成采用固相亚磷酰胺三酯法、ELISA采用间接法。

20 在如下实施例中,所用试剂的来源、商品名和/或有必要列出其组成成分者,均只标明一次。在其后所用相同试剂如无特殊说明,不在赘述上述内容。

实施例 1 CpG 单链脱氧核苷酸的制备(上海生工合成)

合成采用固相亚磷酰胺三酯法,合成方法(上海生工提供)如下:

25 材料和方法:

三氯乙酸(Trichloroacetic Acid, TCA)、可控多孔玻璃(Controlled Pore Glass)、DMT(二甲氧基三苯甲基)、四氮唑活化剂、乙酸酐、N-甲基咪唑、ABI DNA 合成仪、高效液相色谱层析仪等。

A、T、C、G 四种核苷酸单体：合成所用单体为核苷亚磷酰胺，是经过化学修饰的核苷酸，含下面几个功能基团：

1. 3' 位 P 上二异丙胺基，缩合所用的功能基
2. 3' 位 P 上苄乙基，保护基，合成完毕后脱去。
- 5 3. 5' -Dmt，保护基，缩合前脱去。
4. A 和 C 的杂环氨基上的苯甲酸保护基，合成完毕后脱去。
5. G 上嘌呤环氨基上的异丙酰保护基，合成完毕后脱去。

具体的反应步骤如下：

一、脱保护基

- 10 用三氯乙酸(Trichloroacetic Acid, TCA)脱去连结在可控多孔玻璃(Controlled Pore Glass)上的核苷酸的保护基团二甲氧基三苯甲基(DMT)，获得游离的 5'-羟基端，以供下一步缩合反应。

二、活化

- 15 将亚磷酰胺保护的核苷酸单体与四氮唑活化剂混合并进入合成柱，形成亚磷酰胺四唑活性中间体(其 3'-端已被活化，但 5'-端仍受 DMT 保护)，此中间体将与可控多孔玻璃上的已脱保护基的核苷酸发生缩合反应。

三、连接

- 20 亚磷酰胺四唑活性中间体遇到可控多孔玻璃上已脱保护基的核苷酸时，将与其 5'-羟基发生亲合反应，缩合并脱去四唑，此时合成的寡核苷酸链向前延长一个碱基。

四、封闭

- 25 缩合反应后为了防止连在可控多孔玻璃上的未参与反应的 5'-羟基在随后的循环反应中被延伸，常通过乙酰化来封闭此端羟基，一般乙酰化试剂是用乙酸酐和 N-甲基咪唑等混合形成的。

五、氧化

缩合反应时核苷酸单体是通过亚磷酸酯键与连在可控多孔玻璃上的寡核苷酸连接，而亚磷酸酯键不稳定，易被酸、碱水解，此时常用碘的四氢

呋喃溶液将亚磷酰转化为磷酸三酯，得到稳定的寡核苷酸。

经过以上五个步骤后，一个脱氧核苷酸就被连到可控多孔玻璃的核苷酸上，同样再用三氯乙酸脱去新连上的脱氧核苷酸 5'-羟基上的保护基团 DMT 后，重复以上的活化、连接、封闭、氧化过程即可得到一 DNA 片段粗品。最后对其进行切割、脱保护基（一般对 A、C 碱基采用苯甲酰基保护；G 碱基用异丁酰基保护；T 碱基不必保护；亚磷酸用胍乙基保护）、纯化（常用的有 HAP, PAGE, HPLC, C18, OPC 等方法）、定量等合成后处理即可得到符合实验要求的寡核苷酸片段。

未硫化的 CpG 单链脱氧核苷酸在 ABI 3900 DNA 合成仪上合成（上海生工生物技术有限公司），而全硫化及部分硫化的 CpG 单链脱氧核苷酸的合成采用置换法，在 ABI 394 DNA 合成仪上合成（上海生工生物技术有限公司）。

实施例 2 CpG 刺激人外周血单个核细胞增生实验

（一）人外周血单个核细胞的分离

1、试剂和材料：

肝素抗凝的人全血：长春市中心血站。

聚蔗糖-泛影葡胺：比重 1.077 ± 0.001 ，北京鼎国生物技术有限公司。

细胞培养常用的仪器设备：低温冰箱、二氧化碳孵箱、超净工作台、倒置显微镜、液氮罐、蒸馏水器、真空泵、细胞培养瓶、滤菌器、滤过瓶、各种规格的吸管、加样器、滴管、血球计数板、水平式离心机等。

RPMI1640 培养液：

含 L-谷氨酰胺的 RPMI1640 (GIBCOBRL)	10.4 克
碳酸氢钠	2.0 克
庆大霉素	10 万单位
加三蒸水至体积 1000 毫升	
0.22 微米的滤膜真空泵抽滤除菌、分装。	

小牛血清灭活：小牛血清 (Invitrogen) -20°C 取出， 4°C 冰箱融化后， 56°C 水浴 30min。

10%小牛血清的 RPMI1640:

灭活的小牛血清	10 毫升
RPMI 1640 培养液	90 毫升

Hank's 液（无钙离子、镁离子）的配制:

5	氯化钠	8.0 克
	氯化钾	0.4 克
	磷酸氢二钠（带一个结晶水）	0.06 克
	磷酸二氢钾	0.06 克
	碳酸氢钠	0.35 克
10	葡萄糖	1.0 克
	酚红	0.02 克

加入双蒸水至 1000 毫升。

将上列成分混合后溶化，8 磅 15min 灭菌，4℃冰箱保存。临用时用 7.4% NaHCO₃ 调 pH 至 7.3~7.6。

15 2%台盼兰染色液:

台盼兰	2 克
生理盐水	100 毫升

2、方法:

20 肝素抗凝的人外周血缓慢沿管壁缓慢加于比重为 1.077 ± 0.001 的聚蔗糖-泛影葡胺淋巴细胞分层液面上，分离液与外周血的比例约为 2:1。

水平离心机离心 1,000xg 15—20min，离心后管内分为 3 层，用吸管吸取白色云雾层狭窄带，置入另一管中。

25 加入等倍或以上体积的 Hank's 液（无血清），800—1,000xg 10—15min，弃上清，加入 Hank's 液，洗涤细胞两次。

末次离心后，弃上清，加入培养基 2ml，重悬细胞。

取一滴细胞悬液与一滴 0.2%台盼兰染液混合，于血球计数板计数四个大方格内的细胞总数，单个核细胞浓度(细胞数 / 1 毫升细胞悬液) = 4 个大方格内细胞总数 / $4 \times 10^4 \times 2$ (稀释倍数)。

RPMI1640 培养液:

5	碳酸氢钠	2.0 克
---	------	-------

加三蒸水至体积 1000 毫升

小牛血清灭活：小牛血清 (Invitrogen) -20°C 取出， 4°C 冰箱融化后， 56°C 水浴 30min。

灭活的小牛血清	10 毫升
---------	-------

TE 缓冲液 TE 缓冲液 (10mM Tris, 1mM EDTA, HCl 调节 pH 至 7.0。

 $^3\text{H-TDR}$ (25 μl 中含 25 $\mu\text{Ci}^3\text{H-TDR}$)

Eppendorf 管 (0.5ml、1.5ml)

20 液闪计数器

37°C CO₂ 孵箱

用完全培养基调节人外周血单个核细胞（PBMC）至终浓度 3×10^6 个/ml。

将 PBMC 加到 96 孔板中, 每孔 $100\ \mu\text{l}$ (3×10^5 个/孔), 其中含终浓度为 $0.6\ \mu\text{g/ml}$ 的硫代的 CpG, 每个 CpG 三复孔。

11

用细胞收集器收集细胞到滤纸上，60℃孵箱烘烤滤纸 2—3h，将滤纸放入液闪瓶内，加入闪烁液，测 cpm 值

(三) 实验结果 (cpm 值):

5 阴性对照 (未加 CpG ODN) 三个复孔的 cpm 值: 574 544 390

以下为各 CpG ODN 刺激组三个复孔的 cpm 值:

	203:	826	1450	1302
	205:	12514	10594	11006
	302:	7252	6630	6248
10	303:	5284	5624	5396
	305:	2950	9136	10120
	306:	6770	3830	3844
	307:	1740	1718	1962
	304:	11524	13148	11574
15	310:	10854	10210	10258
	607:	12406	15204	14110
	608:	3118	2446	2994
	610:	4228	4362	4624
	619:	2196	7738	7304
20	623:	8598	8056	7576
	631:	6152	6688	6240
	634:	12038	12068	12478
	639:	4194	17894	17652
	640:	16078	16966	17026
25	645:	12100	12424	11556
	647:	17022	14588	16372
	654:	5246	4272	5010
	656:	11704	12446	12378
	657:	4244	3910	4200
30	658:	16206	16602	15506

实施例 3 CpG ODN 刺激人外周单个核细胞表达 CD19

(一) 人外周血单个核细胞的分离

5 1、试剂和材料:

肝素抗凝的人全血: 长春市中心血站。

聚蔗糖-泛影葡胺: 比重 1.077 ± 0.001 , 北京鼎国生物技术有限公司。

10 细胞培养常用的仪器设备: 低温冰箱、二氧化碳孵箱、超净工作台、倒置显微镜、液氮罐、蒸馏水器、真空泵、细胞培养瓶、滤菌器、滤过瓶、各种规格的吸管、加样器、滴管、血球计数板、水平式离心机等。

RPMI1640 培养液:

15 含 L-谷氨酰胺的 RPMI1640 (GIBCOBRL) 10.4 克
 碳酸氢钠 2.0 克
 庆大霉素 10 万单位
 加三蒸水至体积 1000 毫升
 0.22 微米的滤膜真空泵抽滤除菌、分装。

小牛血清灭活: 小牛血清 (Invitrogen) -20°C 取出, 4°C 冰箱融化后, 56°C 水浴 30min。

20 10% 小牛血清的 RPMI1640:

 灭活的小牛血清 10 毫升
 RPMI 1640 培养液 90 毫升

Hank's 液 (无钙离子、镁离子) 的配制:

25 氯化钠 8.0 克
 氯化钾 0.4 克
 磷酸氢二钠 (带一个结晶水) 0.06 克
 磷酸二氢钾 0.06 克
 碳酸氢钠 0.35 克
 葡萄糖 1.0 克
 30 酚红 0.02 克

加入双蒸水至 1000 毫升。

将上列成分混合后溶化，8 磅 15min 灭菌，4℃冰箱保存。临用时用 7.4% NaHCO₃ 调 pH 至 7.3~7.6。

2%台酚兰染色液：

5	台酚兰	2 克
	生理盐水	100 毫升

2、方法：

肝素抗凝的人外周血缓慢沿管壁缓慢加于比重为 1.077 ± 0.001 的聚蔗糖-泛影葡胺淋巴细胞分层液面上，分离液与外周血的比例约为 2:1。

水平离心机离心 $1,000 \times g$ 15—20min 离心后管内分为三层，用吸管吸取白色云雾层狭窄带，置入另一管中。

加入等倍或以上体积的 Hank's 液（无血清）， $800-1,000 \times g$ 10-15min，弃上清，加入 Hank's 液，洗涤细胞两次。末次离心后，弃上清，加入培养基 2ml，重悬细胞。

取一滴细胞悬液与一滴 0.2%台盼兰染液混合，于血球计数板计数四个大方格内的细胞总数，单个核细胞浓度（细胞数 / 1 毫升细胞悬液）= 4 个大方格内细胞总数 / $4 \times 10^4 \times 2$ （稀释倍数）。

3、用流式细胞仪测定人外周血单个核细胞（PBMC）表达的 CD19

1) 用完全培养基调人外周血单个核细胞（PBMC）至终浓度 3×10^6 /ml。将 PBMC 加到 96 孔板中，每孔 $100 \mu l$ (3×10^5 个/孔)。

2) 每孔加入硫代的 CpG ODN，终浓度为 $0.6 \mu g/ml$ ，每种 CpG ODN 设三复孔。37℃5% CO₂ 培养 24—48h。

3) 将 96 孔板 4℃ 1260 转/分钟离心 5min。

4) 弃上清，以 PBS 缓冲液 4℃ 1260 转/分钟离心 5 min 洗两次。

5) 弃上清，以 50 微升 PBS 缓冲液重悬细胞。

6) 每孔按 1:50 加入异硫氰酸荧光素标记的 CD19 抗体，轻弹 96 孔板混匀。冰上避光孵育 30 min。

7) 以 PBS 缓冲液 4℃ 1260 转/分钟离心 5min 洗两次。

8) 以 200 μ lPBS 缓冲液重悬细胞，并移入测试管中，进行流式细胞仪（FACS）检测。结果如图 1 所示。

实施例 4 刺激外周血单个核细胞产生 IL-6

5 (一) 人外周血单个核细胞的分离

1、试剂和材料：

肝素抗凝的人全血：长春市中心血站。

聚蔗糖-泛影葡胺：比重 1.077 ± 0.001 ，北京鼎国生物技术有限公司。

10 细胞培养常用的仪器设备：低温冰箱、二氧化碳孵箱、超净工作台、倒置显微、液氮罐 蒸馏水器、真空泵、细胞培养瓶、滤菌器、滤过瓶、各种规格的吸管、加样器、滴管、血球计数板、水平式离心机等。

RPMI1640 培养液：

15 含 L-谷氨酰胺的 RPMI1640 (GIBCOBRL) 10.4 克
碳酸氢钠 2.0 克
庆大霉素 10 万单位
加三蒸水至体积 1000 毫升

0.22 微米的滤膜真空泵抽滤除菌、分装。

20 小牛血清灭活：小牛血清 (Invitrogen) -20°C 取出， 4°C 冰箱融化后， 56°C 水浴 30min。

10% 小牛血清的 RPMI1640：

灭活的小牛血清 10 毫升
RPMI 1640 培养液 90 毫升

Hank's 液（无钙离子、镁离子）的配制：

25 氯化钠 8.0 克
氯化钾 0.4 克
磷酸氢二钠（带一个结晶水） 0.06 克
磷酸二氢钾 0.06 克
碳酸氢钠 0.35 克
30 葡萄糖 1.0 克

酚红 0.02 克

加入双蒸水至 1000 毫升。

将上列成分混合后溶化，8 磅 15min 灭菌，4℃冰箱保存。临用时用 7.4% NaHCO₃ 调 pH 至 7.3~7.6。

5 2%台盼兰染色液：

台盼兰	2 克
生理盐水	100 毫升

2、方法：

10 肝素抗凝的人外周血缓慢沿管壁缓慢加于比重为 1.077 ± 0.001 的聚蔗糖-泛影葡胺淋巴

细胞分层液面上，分离液与外周血的比例约为 2:1。

水平离心机离心 1,000xg 15—20min，离心后管内分为三层，用吸管吸取白色云雾层狭窄带，置入另一管中。

15 加入等倍或以上体积的 Hank's 液（无血清），800—1,000xg 10-15min，弃上清，加入 Hank's 液，洗涤细胞两次。

末次离心后，弃上清，加入培养基 2ml，重悬细胞。

20 取一滴细胞悬液与一滴 0.2%台盼兰染液混合，于血球计数板计数四个大方格内的细胞总数，单个核细胞浓度(细胞数 / 1 毫升细胞悬液) = 4 个大方格内细胞总数 / $4 \times 10^4 \times 2$ (稀释倍数)。

3、IL-6 的测定

用完全培养基调节人外周血单个核细胞 (PBMC) 至终浓度 3×10^6 个/ml。

25 将 PBMC 加到 96 孔板中，每孔 $100 \mu\text{l}$ (3×10^5 个/孔)，其中含终浓度为 $0.6 \mu\text{g/ml}$ 的硫代的 CpG ODN，每个 CpG ODN，三复孔。培养 24—48 小时后，取上清测 IL-6。

ELISA 试剂盒 (Quantikine R & D) 测定 IL-6 的步骤：

30 (1) 备齐各种试剂和标准品；

- (2) 每孔加入 100 μ l RD1A 试验稀释液;
- (3) 加入 IL-6 标准品或样品 (即 上清) 100 μ l /孔, 置室温孵育 2h;
- (4) 甩干并以缓冲液洗 4 次;
- (5) 加入 200 μ l/孔酶标抗体, 置室温孵育 2 h;
- 5 (6) 甩干并以缓冲液洗 4 四次;
- (7) 加入 200 μ l/孔底物, 置室温 20 min;
- (8) 加入 50 μ l/孔终止液, 450 nm 处读值, 结果如图 2 所示。

实施例 5 增强狂犬疫苗免疫效果实验 (病毒攻击法)

10 狂犬病疫苗增效试验 (NIH 法)

(1) 实验材料

攻击毒株的制备 攻击毒株 CVS 由卫生部中国药品生物制品检定所提供, 启开冻干毒种稀释成 10^{-2} 悬液, 用体重 11-13g 小鼠脑内接种 0.03ml 连续传 2-3 代, 收脑时选择 4—5d 出现典型狂犬病症状的小鼠, 将鼠脑研磨加入适量含正常马血清或小牛血清蒸馏水制成 20%悬液, 1000r/min 离心 10min, 用体重 18-20g 小鼠 15 只做病毒滴定, 符合要求, 分装小管, -60°C 保存。

标准狂犬疫苗由中国药品生物制品检定所提供

(2) 实验步骤

20 狂犬疫苗分组: ①狂犬疫苗 (长春生物制品研究所提供); ②狂犬疫苗+AL(OH)₃ ③CpG640 (10 微克 / 小鼠) +狂犬疫苗; ④CpG647 (10 微克 / 小鼠) +狂犬疫苗; ⑤CpG640 (10 微克 / 小鼠) + AL(OH)₃ +狂犬疫苗; ⑥CpG647 (10 微克 / 小鼠) +狂犬疫苗+ AL(OH)₃ 。
每组狂犬疫苗取 5 \times 、25 \times 、125 \times 三个稀释浓度。

25 标准狂犬疫苗: 取 25 \times 、125 \times 、625 \times 三个稀释浓度。选用体重 12-14g 小鼠 15 只, 每只腹腔接种 0.5ml, 间隔一周后再免疫一次, 并预留 40 只同批小鼠用来测定攻击病毒的 LD₅₀。

攻击: 小鼠第一次免疫后 14d, 预先测定毒株 CVS 的效力为每 0.03ml 含 5-100 \times LD₅₀ 病毒量。将病毒液按 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 稀释。然后用各个稀释度的病毒 (0.03ml) 分别对各组小鼠进
30

行脑内攻击，每组 10 只小鼠。CpG+狂犬疫苗组 15 只小鼠。所有小鼠自攻击之日起观察 14d，攻击后最初 4 日内死亡的小鼠不作统计，第 5d 后死亡和呈现典型脑病症状的小鼠进行计算统计。

疫苗效力测定不低于 2.5 国际单位（IU）/剂为合格。

5 ◇ 结果 见下表（表 1-表 8）。

表 1 狂犬疫苗（长春生物制品研究所）免疫效果

效力试验				疫苗（长春生物制品研究所）					
免疫日期		1 次免疫日期：2002. 7. 26			攻击日期：2002. 8. 09				
		2 次免疫日期：2002. 8. 02.			判定日期：2002. 8. 23				
组别	疫苗浓度	小鼠数	死亡日期及死亡数		14 日	换算		ED ₅₀	
					生	死	生	死	死亡%
被	5×	15	7 ¹	9 ¹	13	2	30	2	
检	25×	15	7 ²	9 ²	11	4	17	6	26.1
苗	125×	15	7 ⁴	9 ⁴ 11 ¹	6	9	6	15	71.4

$$ED_{50}=1.4+(50-26.1) \times 0.7 / (71.4-26.1)=1.77$$

$$10 \quad IU=10^{(1.77-2.29)} \times 6.7=2.02$$

表 2 狂犬疫苗（长春生物制品研究所）+AL（OH）₃ 组免疫效果

效力试验				疫苗（长春生物制品研究所）					
免疫日期		1 次免疫日期：2002. 7. 26			攻击日期：2002. 8. 09				
		2 次免疫日期：2002. 8. 02.			判定日期：2002. 8. 23				
组别	疫苗浓度	小鼠数	死亡日期及死亡数		14 日	换算		ED ₅₀	
					生	死	生	死	死亡%
被	5×	15	9 ¹		14	1	34	1	
检	25×	15	7 ¹	9 ²	12	3	20	4	20
苗	125×	15	7 ³	9 ² 11 ²	8	7	8	11	57.9

$$ED_{50}=1.4+(50-20) \times 0.7 / (57.9-20)=1.95$$

$$IU = 10^{(1.95-2.29)} \times 6.7 = 3.06$$

表 3 CpG640+狂犬疫苗（长春生物制品研究所）组免疫效果

效力试验				疫苗（长春生物制品研究所）				
免疫日期		1 次免疫日期：2002. 7. 26		攻击日期：2002. 8. 09				
		2 次免疫日期：2002. 8. 02.		判定日期：2002. 8. 23				
组别	疫苗浓度	小鼠数	死亡日期及死亡数	14 日 生 死	换算 生 死 死亡%	ED ₅₀		
被	5×	15	9 ¹	14	1	33	1	
检	25×	15	7 ¹ 9 ¹	13	2	19	3	13.6
苗	125×	15	7 ⁴ 9 ⁴ 11 ¹	6	9	6	12	66.7

$$ED_{50} = 1.4 + (50 - 13.6) \times 0.7 / (66.7 - 13.6) = 1.88$$

5 $IU = 10^{(1.88-2.29)} \times 6.7 = 2.60$

表 4 CpG647+狂犬疫苗（长春生物制品研究所）组免疫效果

效力试验				疫苗（长春生物制品研究所）				
免疫日期		1 次免疫日期：2002. 7. 26		攻击日期：2002. 8. 09				
		2 次免疫日期：2002. 8. 02.		判定日期：2002. 8. 23				
组别	疫苗浓度	小鼠数	死亡日期及死亡数	14 日 生 死	换算 生 死 死亡%	ED ₅₀		
被	5×	15	9 ¹	14	1	32	1	
检	25×	15	7 ² 9 ¹	12	3	18	4	18.2
苗	125×	15	7 ⁵ 9 ³ 11 ¹	6	9	6	13	68.4

$$ED_{50} = 1.4 + (50 - 18.2) \times 0.7 / (68.4 - 18.2) = 1.84$$

10 $IU = 10^{(1.84-2.29)} \times 6.7 = 2.37$

表 5 CpG640+狂犬疫苗（长春生物制品研究所）+AL（OH）₃ 组免疫效果

效力试验				疫苗（长春生物制品研究所）					
免疫日期		1 次免疫日期：2002. 7. 26			攻击日期：2002. 8. 09				
		2 次免疫日期：2002. 8. 02.			判定日期：2002. 8. 23				
组别	疫苗浓度	小鼠数	死亡日期及死亡数		14 日	换算		ED ₅₀	
					生	死	生	死	死亡%
被	5×	15	9 ¹		14	1	34	1	
检	25×	15	9 ¹ 11 ¹		13	2	20	3	13
苗	125×	15	7 ³ 9 ⁴ 11 ¹		7	8	7	11	61.1

$$ED_{50}=1.4+(50-13) \times 0.7 / (61.1-13)=1.94$$

$$5 \quad IU=10^{(1.94-2.29)} \times 6.7=2.99$$

表 6 CpG647+狂犬疫苗（长春生物制品研究所）+AL（OH）₃ 免疫效果

效力试验				疫苗（长春生物制品研究所）					
免疫日期		1 次免疫日期：2002. 7. 26			攻击日期：2002. 8. 09				
		2 次免疫日期：2002. 8. 02.			判定日期：2002. 8. 23				
组别	疫苗浓度	小鼠数	死亡日期及死亡数		14 日	换算		ED ₅₀	
					生	死	生	死	死亡%
被	5×	15	7 ¹		14	1	33	1	
检	25×	15	7 ¹ 9 ¹ 11 ¹		12	3	19	4	17.4
苗	125×	15	7 ³ 9 ⁴ 11 ¹		7	8	7	12	63.2

$$ED_{50}=1.4+(50-17.4) \times 0.7 / (63.2-17.4)=1.90$$

$$IU=10^{(1.90-2.29)} \times 6.7=2.73$$

表 7 标准苗（中国药品生物制品检定所）组免疫效果

效力试验				疫苗							
免疫日期		1 次免疫日期：2002. 7. 26				攻击日期：2002. 8. 09					
		2 次免疫日期：2002. 8. 02.				判定日期：2002. 8. 23					
组别	疫苗浓度	小鼠数 (只)	死亡日期及死亡数 (d ⁿ)			14 日		换算			ED ₅₀
						生	死	生	死	死亡%	
标准	25×	15	7 ¹	9 ¹		13	2	26	2		
准	125×	15	7 ²	9 ³	11 ¹	9	6	13	8	38.1	
苗	625×	15	7 ⁴	8 ²	10 ³ 12 ²	4	11	4	19	82.6	

$$ED_{50}=2.1+(50-38.1) \times 0.7 / (82.6-38.1)=2.29$$

5 IU=6.7

表 8 攻击毒测定结果

毒株 CVS 的效力				攻击日期：2002. 8. 09					
				判定日期：2002. 8. 23					
组别	病 毒 稀 释 度	小 鼠 数 (只)	死亡日期及死亡数	14 日		换算			ED ₅₀
				生	死	生	死	死亡%	
攻 击 毒 测 定	10 ⁰	10	7 ¹⁰	0	10	0	24		1.91
	10 ⁻¹	10	7 ⁶ 9 ³	1	9	1	14	93.3	
	10 ⁻²	10	7 ³ 9 ²	5	5	6	5	45.5	
	10 ⁻³	10		10	0	16	0		

(3) 结论

10

各组 IU 值如下：

表 1 狂犬疫苗组：2.02

表 2 狂犬疫苗+AL(OH)：3.06

表 3 CpG640+狂犬疫苗组：2.60

表 4 CpG647+狂犬疫苗组：2.37

表 5 CpG640+狂犬疫苗+AL (OH) : 2.99

表 6 CpG647+狂犬疫苗+AL (OH) : 2.73

- 5 从各组结果中可以看出，除了第 1 组（狂犬疫苗组 IU=2.02）和第 4 组（CpG647+狂犬疫苗组 IU= 2.37）IU <2.5 之外，其余各组 IU 均大于 2.5，证明 CpG ODN 确实可以增强狂犬疫苗的免疫效果。

在狂犬疫苗的稀释度为 25 倍稀释时各组受试小鼠的死亡率分别为：

10 表 1 狂犬疫苗组：26.1

表 2 狂犬疫苗+AL (OH) :20

表 3 CpG640+狂犬疫苗组:13.6

表 4 CpG647+狂犬疫苗组:18.2

表 5 CpG640+狂犬疫苗+AL (OH) :13

15 表 6 CpG647+狂犬疫苗+AL (OH) :17.4

上述结果表明 CpG640、CpG647 对狂犬疫苗有增效作用。

实施例 6 增强狂犬疫苗免疫效果实验（抗体检测法）

20 一、实验动物及分组：

70 只 7 周龄昆明种小鼠，体重 20 ± 2 克，随机分为 14 组，每组 5 只，分笼饲养，免疫前先适应 2 天。

二、免疫途径及剂量：

25 1-13 组小鼠：肌肉注射 $1 \mu\text{g}$ 重组狂犬疫苗（长春生物制品研究所）/ $100 \mu\text{l}$ PBS 加 $10 \mu\text{g}$ CpG ODN，分两点注射，即双后肢肌肉每点注射 $50 \mu\text{l}$ 。

30 14 组：肌肉注射 $1 \mu\text{g}$ 重组重组狂犬疫苗（长春生物制品研究所）/ $100 \mu\text{l}$ PBS，（无 CpG ODN），分两点注射，即双后肢肌肉每点注射 $50 \mu\text{l}$ 。

三、 免疫程序:

于 0、21d 免疫, 第二次免疫后 7d 经尾动脉采血, 每只小鼠分离 10 μ l 血清, 直接检测抗体滴度或置-20℃冻存。

5 四、 抗体效价的测定 (间接法 ELISA)

试剂器材:

包被缓冲液 (0.05mol/L 碳酸盐缓冲液, pH9.6):

Na_2CO_3 1.59 克

NaHCO_3 2.93 克

10 加蒸馏水至 1000 毫升

洗涤缓冲液 (PBS-T): 含 0.05%吐温-20, pH7.4

K_2HPO_4 0.2 克

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9 克

NaCl 8.0 克

15 KCl 0.2 克

Tween-20 0.5 毫升

加蒸馏水至 1000ml

样品稀释液:

牛血清白蛋白 (BSA) 0.1 克

20 加洗涤缓冲液至 100 毫升

封闭液 (2%BSA):

牛血清白蛋白 (BSA) 2 克

加 PBS (pH7.4) 至 100 毫升

底物缓冲液 (磷酸-柠檬酸缓冲液, pH=5.0):

25 ● 甲液 (0.1 mol/L 柠檬酸)

柠檬酸 1.92 克

加蒸馏水至 100 毫升

● 乙液 (0.2 mol/L Na_2HPO_4)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 7.17 克

30 加蒸馏水至 100 毫升

取甲液 24.3mL, 乙液 25.7mL, 加蒸馏水至 100 毫升
四甲基联苯胺溶液(TMB):2 毫克/毫升

TMB	10 毫克
乙醇	5 毫升

5 底物溶液:

底物缓冲液	10 毫升
TMB(2 毫克/毫升)	0.5 毫升
30% H_2O_2	10 微升

终止液:

10	浓 H_2SO_4	22ml
	蒸馏水	178ml

步骤

1. 包被: 用包被缓冲液稀释狂犬疫苗(中国长春生物制品研究所提供)至 1—10 微克 / 毫升, 加入酶标板, 100ul/孔, 4℃, 过夜。
2. 洗涤: 用洗涤缓冲液洗板 3 次, 5min/次。
3. 封闭: 加入 2%BSA 封闭, 200ul/孔。37℃, 1.5h。
4. 洗涤: 用洗涤缓冲液洗板 3 次, 5min/次。
- 20 5. 加样: 将待测血清用样品稀释液做 400 倍稀释, 100ul/孔。空白对照孔加样品稀释液, 100ul/孔, 每个样品设 3 个复孔。37℃, 60min。
6. 洗涤: 用洗涤缓冲液洗板 3 次, 5min/次。
7. 加酶标抗体: 将兔抗鼠 IgG-HRP (北京鼎国生物 0.1ml, 1:1000) 用洗涤缓冲液稀释 500 倍, 100ul/孔, 37℃, 60min。
- 25 8. 洗涤: 用洗涤缓冲液洗板 3 次, 5min/次。
9. 显色: 加入底物溶液, 100ul/孔。室温避光反应 10-30min。
10. 终止: 50 ul/孔 2M H_2SO_4 。
11. 酶标仪 (BIO-RAD Model 550) 测 A_{450} 。

30 五、结果

1-13 组小鼠 (肌肉注射 1 μ g 狂犬病毒疫苗/100 μ l PBS 加 10 μ g CpG ODN)

14 组小鼠 (肌肉注射 1 μ g 狂犬病毒疫苗/100 μ l PBS)

5	1 组 (205):	1).	0.576	0.566	0.587
		2).	0.682	0.618	0.657
		3).	0.510	0.538	0.566
		4).	0.656	0.751	0.715
		5).	0.658	0.689	0.611
10	2 组 (302):	1).	0.775	0.734	0.691
		2).	0.759	0.790	0.719
		3).	0.630	0.615	0.626
		4).	0.688	0.657	0.663
		5).	0.943	0.847	0.899
15	3 组 (304):	1).	0.824	0.834	0.810
		2).	0.681	0.658	0.615
		3).	0.619	0.647	0.656
		4).	0.607	0.634	0.612
		5).	0.787	0.768	0.754
20	4 组 (310):	1).	0.645	0.674	0.652
		2).	0.749	0.690	0.724
		3).	0.775	0.784	0.732
		4).	0.644	0.674	0.646
		5).	0.688	0.693	0.648
25	5 组 (607):	1).	0.723	0.719	0.747
		2).	0.702	0.635	0.697
		3).	0.818	0.787	0.800
		4).	0.790	0.786	0.691
		5).	0.890	0.831	0.817
30	6 组 (634):	1).	0.754	0.699	0.658
		2).	0.655	0.606	0.677
		3).	0.727	0.787	0.719

	4).	0.693	0.685	0.732
	5).	0.556	0.588	0.543
	7 组 (639):	1).	0.976	0.919
		2).	0.768	0.717
5		3).	0.886	0.876
		4).	1.012	1.007
		5).	0.868	0.839
	8 组 (640):	1).	0.819	0.836
		2).	0.670	0.625
10		3).	1.283	1.186
		4).	1.366	1.212
		5).	0.975	0.980
	9 组 (645):	1).	0.876	0.827
		2).	0.925	0.898
15		3).	0.732	0.744
		4).	0.850	0.824
		5).	0.689	0.723
	10 组 (647):	1).	0.968	0.978
		2).	0.983	0.982
20		3).	0.988	0.980
		4).	1.179	1.280
		5).	1.006	0.979
	11 组 (656):	1).	0.682	0.672
		2).	0.796	0.752
25		3).	0.658	0.686
		4).	0.615	0.597
		5).	0.687	0.690
	12 组 (657):	1).	0.778	0.729
		2).	0.628	0.710
30		3).	0.676	0.667

	4).	0.635	0.721	0.677
	5).	0.690	0.682	0.735
	13 组 (658): 1).	0.673	0.667	0.712
	2).	0.615	0.710	0.694
5	3).	0.834	0.876	0.887
	4).	0.870	0.818	0.823
	5).	0.673	0.685	0.655
	14 组 (659): 1).	1.327	1.289	1.017
	2).	0.968	0.972	0.991
10	3).	1.117	1.276	0.991
	4).	0.860	0.874	0.870
	5).	0.886	0.816	0.854
	15 组 (对照): 1).	0.477	0.423	0.456
	2).	0.506	0.497	0.486
15	3).	0.399	0.401	0.435
	4).	0.455	0.427	0.417
	5).	0.368	0.398	0.406
	背景值:	0.332	0.287	0.319

20 上述结果表明, 1-13 组内抗体效价都明显高与对照组, 其中以第 7 组 (CpG ODN 639), 第 8 组 (CpG ODN 640), 第 10 组 (CpG ODN 647), 第 14 组 (CpG ODN 659) 抗体滴度升高最明显。

实施例 7 增强乙型肝炎疫苗的免疫效果实验

25 一. 实验动物及分组:

156 只 7 周龄昆明种小鼠, 体重 20 ± 2 克, 随机分为 26 组, 每组 6 只, 分笼饲养, 免疫前先适应 2d。

二. 免疫途径及剂量:

30 1-25 组小鼠: 肌肉注射 $1\mu\text{g}$ 重组 HBsAg (中国长春生物制品研究所提供) / $100\mu\text{l}$ PBS 加 $10\mu\text{g}$ CpG ODN, 分两点注射, 即双后肢肌肉每点注

射 50 μ l。

26 组：肌肉注射 1 μ g 重组 HBsAg/100 μ l PBS，未加 CpG ODN，分两点注射，即双后肢肌肉每点注射 50 μ l。

三. 免疫程序：

- 5 0d、21d 免疫，第二次免疫后 7 天静脉采血，每只小鼠分离 10 μ l 血清，直接测抗体滴度或置-20℃冻存。

四、抗体效价的测定（间接法 ELISA）

试剂器材：

包被缓冲液(0.05mol/L 碳酸盐缓冲液, pH9.6)：

10	Na_2CO_3	1.59 克
	NaHCO_3	2.93 克
	加蒸馏水至 1000 毫升	

洗涤缓冲液(PBS-T)：含 0.05%吐温-20, pH7.4

	K_2HPO_4	0.2 克
15	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.9 克
	NaCl	8.0 克
	KCl	0.2 克
	Tween-20	0.5 毫升
	加蒸馏水至 1000ml	

20 样品稀释液：

牛血清白蛋白(BSA) 0.1 克
加洗涤缓冲液至 100 毫升

封闭液(2%BSA)：

牛血清白蛋白(BSA) 2 克
25 加 PBS (pH7.4) 至 100 毫升

底物缓冲液(磷酸-柠檬酸缓冲液, pH=5.0)：

- 甲液(0.1 mol/L 柠檬酸)

柠檬酸 1.92 克

加蒸馏水至 100 毫升

- 30 ● 乙液(0.2 mol/L Na_2HPO_4)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 7.17 克

加蒸馏水至 100 毫升

取甲液 24.3mL, 乙液 25.7mL, 加蒸馏水至 100 毫升

四甲基联苯胺溶液(TMB): 2 毫克/毫升

5	TMB	10 毫克
	乙醇	5 毫升

底物溶液:

	底物缓冲液	10 毫升
	TMB(2 毫克/毫升)	0.5 毫升
10	30% H_2O_2	10 微升

终止液:

浓 H_2SO_4	22ml
蒸馏水	178ml

15 步骤

1. 包被: 用包被缓冲液稀释 HBsAg (中国长春生物制品研究所提供) 至 1—10 微克 / 毫升, 加入酶标板, 100ul/孔, 4℃, 过夜。
2. 洗涤: 用洗涤缓冲液洗板 3 次, 5min/次。
- 20 3. 封闭: 加入 2%BSA 封闭, 200ul/孔。37℃, 1.5h。
4. 洗涤: 用洗涤缓冲液洗板 3 次, 5min/次。
5. 加样: 将待测血清用样品稀释液做 400 倍稀释, 100ul/孔。空白对照孔加样品稀释液, 100ul/孔, 每个样品设 3 个复孔。37℃, 60min。
- 25 6. 洗涤: 用洗涤缓冲液洗板 3 次, 5min/次。
7. 加酶标抗体: 将兔抗鼠 IgG-HRP (北京鼎国生物 0.1ml, 1:1000) 用洗涤缓冲液稀释 500 倍, 100ul/孔, 37℃, 60min。
8. 洗涤: 用洗涤缓冲液洗板 3 次, 5min/次。
- 30 9. 显色: 加入底物溶液, 100ul/孔。室温避光反应 10-30min。

10. 终止: 50 μ l/孔 2M H_2SO_4 。

11. 酶标仪 (BIO-RAD Model 550) 测 A_{450} 。

四、结果

1-25 组小鼠: (肌肉注射 1 μ g 重组 HBsAg /100 μ l PBS 加 10 μ g CpG			
5	ODN)		
10	1 组 (203):	1).	0.562 0.573 0.575
		2).	0.581 0.573 0.570
		3).	0.580 0.580 0.576
		4).	0.561 0.555 0.560
		5).	0.577 0.578 0.573
		6).	0.555 0.548 0.559
15	2 组 (205):	1).	0.762 0.777 0.775
		2).	0.589 0.582 0.590
		3).	0.681 0.684 0.686
		4).	0.600 0.655 0.661
		5).	0.878 0.885 0.866
		6).	0.644 0.654 0.668
20	3 组 (302)	1).	0.762 0.777 0.775
		2).	0.589 0.582 0.590
		3).	0.681 0.684 0.686
		4).	0.600 0.655 0.661
		5).	0.878 0.885 0.866
		6).	0.644 0.654 0.668
25	4 组 (303)	1).	0.444 0.479 0.500
		2).	0.498 0.500 0.490
		3).	0.580 0.584 0.568
		4).	0.443 0.455 0.462
		5).	0.478 0.481 0.486
		6).	0.640 0.645 0.681
30	5 组 (305):	1).	0.645 0.700 0.665

		2).	0.749	0.665	0.691
		3).	0.880	0.883	0.800
		4).	0.920	0.895	0.914
		5).	0.900	0.879	0.886
5		6).	0.886	0.876	0.811
	6 组 (306):	1).	0.545	0.601	0.577
		2).	0.557	0.606	0.609
		3).	0.780	0.893	0.789
		4).	0.691	0.677	0.694
10		5).	0.567	0.579	0.559
		6).	0.666	0.677	0.632
	7 组 (307):	1).	0.762	0.775	0.757
		2).	0.658	0.665	0.661
		3).	0.583	0.586	0.579
15		4).	0.665	0.656	0.668
		5).	0.757	0.800	0.754
		6).	0.555	0.548	0.559
	8 组 (304):	1).	0.876	0.887	0.854
		2).	0.958	0.889	0.959
20		3).	0.766	0.749	0.776
		4).	0.860	0.845	0.866
		5).	0.879	0.858	0.786
		6).	0.464	0.455	0.458
	9 组 (310):	1).	0.773	0.701	0.690
25		2).	0.879	0.866	0.882
		3).	0.880	0.800	0.854
		4).	0.792	0.805	0.811
		5).	0.669	0.739	0.808
		6).	0.668	0.678	0.651
30	10 组 (607):	1).	0.676	0.680	0.733

	2).	0.968	0.890	0.955
	3).	0.588	0.586	0.573
	4).	0.665	0.721	0.776
	5).	0.887	0.802	0.811
5	6).	0.875	0.885	0.659
	11 组 (608): 1).	0.776	0.769	0.717
	2).	0.658	0.715	0.691
	3).	0.776	0.768	0.761
	4).	0.760	0.716	0.776
10	5).	0.687	0.681	0.666
	6).	0.764	0.786	0.778
	12 组 (610): 1).	0.762	0.777	0.775
	2).	0.589	0.582	0.590
	3).	0.681	0.684	0.686
15	4).	0.600	0.655	0.661
	5).	0.878	0.885	0.866
	6).	0.644	0.654	0.668
	13 组 (619): 1).	0.7325	0.697	0.765
	2).	0.674	0.656	0.682
20	3).	0.880	0.883	0.800
	4).	0.920	0.895	0.914
	5).	0.900	0.879	0.886
	6).	0.688	0.675	0.684
	14 组 (623): 1).	0.544	0.587	0.545
25	2).	0.695	0.668	0.659
	3).	0.557	0.517	0.565
	4).	0.600	0.645	0.586
	5).	0.587	0.557	0.499
	6).	0.564	0.555	0.612
30	15 组 (631): 1).	0.817	0.855	0.823

	2).	0.912	0.899	0.887
	3).	0.576	0.677	0.605
	4).	0.816	0.824	0.800
	5).	0.789	0.758	0.715
5	6).	0.590	0.612	0.630
	16 组 (634): 1).	0.668	0.612	0.634
	2).	0.758	0.781	0.796
	3).	0.666	0.712	0.734
	4).	0.686	0.684	0.785
10	5).	0.647	0.585	0.703
	6).	0.844	0.820	0.894
	17 组 (639): 1).	1.277	1.101	1.169
	2).	1.118	1.008	1.082
	3).	9.880	9.908	9.485
15	4).	9.779	9.811	9.998
	5).	0.866	0.799	0.818
	6).	1.266	1.344	1.116
	18 组 (640): 1).	1.133	1.112	1.331
	2).	1.216	1.200	1.228
20	3).	0.771	0.912	0.884
	4).	0.878	0.833	0.773
	5).	0.944	0.899	0.912
	6).	1.441	1.432	1.500
	19 组 (645): 1).	0.722	0.754	0.733
25	2).	0.685	0.671	0.657
	3).	0.814	0.851	0.811
	4).	0.971	0.918	0.932
	5).	0.766	0.745	0.789
	6).	0.866	0.701	0.816
30	20 组 (647): 1).	1.327	1.310	1.216

	2).	1.222	1.108	1.130
	3).	9.999	9.904	9.749
	4).	1.277	1.311	1.291
	5).	0.867	0.813	0.828
5	6).	1.126	1.135	1.131
	21 组 (654): 1).	0.667	0.736	0.728
	2).	0.776	0.766	0.752
	3).	0.977	0.912	0.899
	4).	0.751	0.713	0.722
10	5).	0.611	0.644	0.601
	6).	0.876	0.889	0.793
	22 组 (656): 1).	0.567	0.568	0.536
	2).	0.896	0.811	0.895
	3).	0.658	0.651	0.662
15	4).	0.886	0.821	0.779
	5).	1.118	0.980	1.198
	6).	0.769	0.802	0.798
	23 组 (657): 1).	1.222	1.198	1.009
	2).	0.689	0.585	0.599
20	3).	0.768	0.714	0.745
	4).	0.760	0.672	0.611
	5).	0.812	0.856	0.825
	6).	0.649	0.657	0.689
	24 组 (658): 1).	0.777	0.768	0.705
25	2).	0.699	0.658	0.643
	3).	0.581	0.605	0.616
	4).	0.656	0.678	0.690
	5).	0.811	0.856	0.844
	6).	0.764	0.776	0.800
30	25 组 (659): 1).	1.127	1.111	1.136

	2).	1.008	1.008	1.032
	3).	0.780	0.811	0.854
	4).	1.002	1.238	1.349
	5).	0.986	0.989	0.811
5	6).	1.126	1.134	1.117
26 组小鼠 (对照, 肌肉注射 1 μ g 重组 HBsAg /100 μ l PBS)				
	1).	0.441	0.456	0.399
	2).	0.458	0.473	0.412
	3).	0.397	0.401	0.423
10	4).	0.500	0.515	0.492
	5).	0.445	0.413	0.523
	6).	0.387	0.392	0.328

背景值: 0.311 0.259 0.289

15

上述实验结果显示, 1-25 组 HbsAb 的滴度普遍高于 26 组 (对照), 其中以 20 组 (647) 和 25 组 (659) 最高, 其次为 17 组 (639), 18 组 (640), 22 组 (656) 以及 23 组 (657), 说明 CpG ODN 增强了 HbsAg 的免疫原性, 促进 HbsAb 的产生。

20

实施例 8: 增强流感病毒疫苗的免疫效果

一. 实验动物及分组:

70 只 7 周龄昆明种小鼠, 体重 20 ± 2 克, 随机分为 14 组, 每组 5 只, 分笼饲养, 免疫前先适应 2 d。

25 二. 免疫途径及剂量:

1-13 组小鼠: 肌肉注射 1 μ g 流感病毒疫苗 (长春生物制品研究所) /100 μ l PBS 加 10 μ g CpG ODN, 分两点注射, 即双后肢肌肉每点注射 50 μ l。

14 组: 肌肉注射 1 μ g 流感病毒疫苗 (长春生物制品研究所) /100 μ l PBS, (无 CpG ODN), 分两点注射, 即双后肢肌肉每点注射 50 μ l。

30

三. 免疫程序:

0、21d 免疫, 第二次免疫后 7d 经尾动脉采血, 每只小鼠分离 10 μ l 血清, 直接测抗体滴度或置 -20°C 冻存。

5 五、 抗体效价的测定 (间接法 ELISA)

试剂器材:

包被缓冲液 (0.05mol/L 碳酸盐缓冲液, pH9.6):

Na_2CO_3 1.59 克

NaHCO_3 2.93 克

10 加蒸馏水至 1000 毫升

洗涤缓冲液 (PBS-T): 含 0.05% 吐温-20, pH7.4

K_2HPO_4 0.2 克

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9 克

NaCl 8.0 克

15 KCl 0.2 克

Tween-20 0.5 毫升

加蒸馏水至 1000ml

样品稀释液:

牛血清白蛋白 (BSA) 0.1 克

20 加洗涤缓冲液至 100 毫升

封闭液 (2%BSA):

牛血清白蛋白 (BSA) 2 克

加 PBS (pH7.4) 至 100 毫升

底物缓冲液 (磷酸-柠檬酸缓冲液, pH=5.0):

25 ● 甲液 (0.1 mol/L 柠檬酸)

柠檬酸 1.92 克

加蒸馏水至 100 毫升

● 乙液 (0.2 mol/L Na_2HPO_4)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 7.17 克

30 加蒸馏水至 100 毫升

取甲液 24.3mL, 乙液 25.7mL, 加蒸馏水至 100 毫升
四甲基联苯胺溶液(TMB):2 毫克/毫升

TMB	10 毫克
乙醇	5 毫升

5 底物溶液:

底物缓冲液	10 毫升
TMB(2 毫克/毫升)	0.5 毫升
30% H_2O_2	10 微升

终止液:

10 浓 H_2SO_4	22ml
蒸馏水	178ml

步骤

1. 包被: 用包被缓冲液稀释流感病毒疫苗(中国长春生物制品研究所提供)至 1—10 微克/毫升, 加入酶标板, 100ul/孔, 4℃, 过夜。
2. 洗涤: 用洗涤缓冲液洗板 3 次, 5min/次。
3. 封闭: 加入 2%BSA 封闭, 200ul/孔。37℃, 1.5h。
4. 洗涤: 用洗涤缓冲液洗板 3 次, 5min/次。
- 20 5. 加样: 将待测血清用样品稀释液做 400 倍稀释, 100ul/孔。空白对照孔加样品稀释液, 100ul/孔, 每个样品设 3 个复孔。37℃, 60min。
6. 洗涤: 用洗涤缓冲液洗板 3 次, 5min/次。
7. 加酶标抗体: 将兔抗鼠 IgG-HRP(北京鼎国生物 0.1ml, 1:1000)用洗涤缓冲液稀释 500 倍, 100ul/孔, 37℃, 60min。
- 25 8. 洗涤: 用洗涤缓冲液洗板 3 次, 5min/次。
9. 显色: 加入底物溶液, 100ul/孔。室温避光反应 10-30min。
10. 终止: 50 ul/孔 2M H_2SO_4 。
11. 酶标仪(BIO-RAD Model 550)测 A_{450} 。

30 四、结果

1-13 组小鼠（肌肉注射 1 μg 流感病毒疫苗/100 μl PBS 加 10 μg CpG ODN）

14 组小鼠（肌肉注射 1 μg 流感病毒疫苗/100 μl PBS）

5	1 组 (205):	1).	0.632	0.598	0.653
		2).	0.628	0.675	0.634
		3).	0.528	0.563	0.577
		4).	0.633	0.701	0.680
		5).	0.695	0.639	0.629
10	2 组 (302):	1).	0.723	0.769	0.693
		2).	0.734	0.786	0.723
		3).	0.613	0.678	0.645
		4).	0.636	0.668	0.654
		5).	0.899	0.864	0.874
15	3 组 (304):	1).	0.837	0.898	0.829
		2).	0.676	0.669	0.632
		3).	0.696	0.637	0.685
		4).	0.707	0.689	0.670
		5).	0.887	0.912	0.943
20	4 组 (310):	1).	0.623	0.659	0.672
		2).	0.720	0.790	0.728
		3).	0.767	0.745	0.744
		4).	0.674	0.614	0.675
		5).	0.617	0.635	0.677
25	5 组 (607):	1).	0.872	0.819	0.856
		2).	0.670	0.635	0.690
		3).	0.835	0.887	0.876
		4).	0.679	0.705	0.691
		5).	0.834	0.825	0.856
30	6 组 (634):	1).	0.745	0.678	0.677
		2).	0.634	0.655	0.689
		3).	0.766	0.746	0.734

	4).	0.869	0.876	0.821	
	5).	0.734	0.797	0.738	
	7 组 (639):	1).	0.913	0.945	0.949
		2).	0.676	0.617	0.690
5		3).	0.782	0.785	0.732
		4).	1.101	1.206	1.218
		5).	0.768	0.735	0.795
	8 组 (640):	1).	0.778	0.821	0.823
		2).	0.767	0.768	0.753
10		3).	1.008	1.318	1.104
		4).	1.237	1.134	1.231
		5).	0.900	0.918	0.922
	9 组 (645):	1).	0.887	0.898	0.825
		2).	0.892	0.875	0.895
15		3).	0.767	0.735	0.723
		4).	0.785	0.756	0.801
		5).	0.638	0.776	0.732
	10 组 (647):	1).	0.974	0.932	0.998
		2).	0.912	0.967	1.055
20		3).	0.898	0.998	0.938
		4).	1.217	1.223	1.021
		5).	1.105	0.956	0.923
	11 组 (656):	1).	0.658	0.644	0.689
		2).	0.813	0.876	0.874
25		3).	0.768	0.695	0.684
		4).	0.634	0.612	0.673
		5).	0.611	0.649	0.673
	12 组 (657):	1).	0.769	0.714	0.783
		2).	0.634	0.705	0.701
30		3).	0.654	0.698	0.708

	4).	0.763	0.765	0.699
	5).	0.790	0.745	0.783
	13 组 (658): 1).	0.767	0.745	0.798
	2).	0.761	0.703	0.685
5	3).	0.790	0.804	0.812
	4).	0.752	0.758	0.782
	5).	0.688	0.675	0.685
	14 组 (659): 1).	0.932	0.978	1.015
	2).	0.896	0.921	0.943
10	3).	1.007	1.234	0.995
	4).	0.786	0.723	0.759
	5).	0.988	0.908	0.954
	15 组 (对照): 1).	0.444	0.428	0.432
	2).	0.501	0.489	0.473
15	3).	0.376	0.400	0.387
	4).	0.478	0.465	0.443
	5).	0.396	0.400	0.412
	背景值:	0.301	0.298	0.289。

SEQUENCE LISTING

5

<110> 长春华普生物技术有限公司

10 <120> 增强蛋白类疫苗免疫效果的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸

15

<130> I030020

<160> 81

20

<170> PatentIn version 3.1

25

<210> 1

<211> 20

30

<212> DNA

<213> Artificial

35

<400> 1

tcgtcgaggg cgccggtgac

20

40

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

1030020

<213> Artificial

5

<400> 2

tcgtcgccgg tgggggtgtg

20

10 <210> 3

<211> 20

<212> DNA

15

<213> Artificial

20 <400> 3

tcgtcgtacg caattgtctt

20

<210> 4

25

<211> 20

<212> DNA

30 <213> Artificial

-

<400> 4

35 tcgcctcgtc gccttcgagc

20

<210> 5

40 <211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

45

```
<400> 5
tcgccaccg gtggggggggg
```

5

<211> 21

10

<213> Artificial

15

```
<400> 6
tcgtcgcaga ccggtctggg g
```

20

<210> 7

<211> 20

25

<212> DNA

<213> Artificial

30

<400> -7
gggggacgtc gccggggggg

20

35

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

40

<213> Artificial

45

<400> 8

	1030020	
	ggatccgtac gcatgggggg	20
	<210> 9	
5	<211> 20	
	<212> DNA	
10	<213> Artificial	
	<400> 9	
15	tcgtcgcggc cggcgccccc	20
	<210> 10	
20	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
25		
	<400> 10	
30	tcgtcgcggc cgcgaggggg	20
	<210> 11	
	<211> 25	
35	<212> DNA	
	<213> Artificial	
40		
	<400> 11	
45	tcgtcgttac cgatgacgtc gccgt	25

1030020
 <210> 12

 <211> 26

 5 <212> DNA

 <213> Artificial

 10
 <400> 12
 tcgtcgggtg cgacgtcgca gggggg 26

 15 <210> 13

 <211> 27

 <212> DNA
 20
 <213> Artificial

 25 <400> 13
 tcgtcgggtg cgacgatcgt cgggggg 27

 <210> 14
 30
 <211> 29

 <212> DNA
 35 <213> Artificial

 <400> 14
 40 tcgtcgtttg catcgatgca gtcgtcgtt 29

 <210> 15
 45 <211> 27

1030020

<212> DNA

<213> Artificial

5

<400> 15

tcgtcgtttg catcgatgca ggggggg

27

10

<210> 16

<211> 24

15

<212> DNA

<213> Artificial

20

<400> 16

accggtatcg atgccggtgg gggg

24

25

<210> 17

<211> 27

30

<212> DNA

-

<213> Artificial

35

<400> 17

gggggtccatg acgttcctga agggggg

27

40

<210> 18

<211> 26

<212> DNA

45

1030020

<213> Artificial

5 <400> 18

tcgtcgtttt gacgatcgtc gggggg

26

<210> 19

10

<211> 30

<212> DNA

15 <213> Artificial

<400> 19

20 ttcgtcgttt gatcgatggt cgttgggggg

30

<210> 20

25 <211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

30

<400> 20

ttcgtcgttg tgatcgatgg gggg

24

35

<210> 21

<211> 28

40

<212> DNA

<213> Artificial

45

1030020

<400> 21

tatcgatggtt ttcgtcgtcg ttgggggg

28

5

<210> 22

<211> 28

10 <212> DNA

<213> Artificial

15

<400> 22

ttcgttgcat cgatgcatcg ttgggggg

28

20 <210> 23

<211> 24

<212> DNA

25

<213> Artificial

30 <400> 23

ttcgcttcgc ttttcgcttc gctt

24

<210> 24

35

<211> 21

<212> DNA

40 <213> Artificial

<400> 24

45 tcgaggacaa gattctcgtg c

21

1030020

<210> 25

5 <211> 26

<212> DNA

10 <213> Artificial

<400> 25

15 tcgaggacaa gattctcgtg caggcc 26

<210> 26

20 <211> 21

<212> DNA

25 <213> Artificial

<400> 26

30 tcgtgcaggc caacgaggcc g 21

<210> 27

<211> 26

35 <212> DNA

<213> Artificial

40 <400> 27

accgccaagg agaagccgca ggaggg 26

45 <210> 28

1030020

<211> 16

<212> DNA

5

<213> Artificial

10 <400> 28

tcgttgccgt cggccc

16

<210> 29

15

<211> 19

<212> DNA

20 <213> Artificial

<400> 29

25 tacaacggcg aggaatacc

19

<210> 30

30 <211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

35

<400> 30

tcggcacgcg acgtgctggc cgtcgtttcc

30

40

<210> 31

<211> 21

45

1030020

<212> DNA

<213> Artificial

5

<400> 31
gtacaacggc gaggaatacc t 21

10

<210> 32

<211> 20

15 <212> DNA

<213> Artificial

20

<400> 32
accgtcgttg ccgtcggccc 20

25 <210> 33

<211> 14

<212> DNA

30

<213> Artificial

35 <400> 33
tgctggccgt cggtt 14

40

<210> 34

<211> 14

<212> DNA

45 <213> Artificial

	<400> 34	
5	gtcggcacgc gacg	14
	<210> 35	
10	<211> 19	
	<212> DNA	
15	<213> Artificial	
	<400> 35	
20	gtcggcacgc gacgggggg	19
	<210> 36	
	<211> 20	
25	<212> DNA	
	<213> Artificial	
30	-	
	<400> 36	
	gtcggcacgc gacgcccccc	20
35	<210> 37	
	<211> 22	
40	<212> DNA	
	<213> Artificial	
45		

	1030020		
	<400> 37		
	tcgttgccgt cggcccccc cc		22
5	<210> 38		
	<211> 19		
	<212> DNA		
10	<213> Artificial		
15	<400> 38		
	tcgttgccgt cggcccccc		19
	<210> 39		
20	<211> 18		
	<212> DNA		
25	<213> Artificial		
	<400> 39		
30	tcgttgccgt cggcccccc		18
	<210> 40		
35	<211> 17		
	<212> DNA		
	<213> Artificial		
40			
	<400> 40		
	tcgttgccgt cggcccc		17
45			

1030020

<210> 41

<211> 20

5

<212> DNA

<213> Artificial

10

<400> 41

tcgttgccgt cggccccccc

20

15

<210> 42

<211> 13

20 <212> DNA

<213> Artificial

25

<400> 42

tcgttgccgt cgg

13

30 <210> 43

<211> 14

<212> DNA

35

<213> Artificial

40 <400> 43

tcgttgccgt cgagg

14

<210> 44

45

1030020

<211> 15

<212> DNA

5 <213> Artificial

<400> 44

10 tcgttgccgt cgggg 15

<210> 45

15 <211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

20

<400> 45

25 tcgttgccgt cggggg 16

<210> 46

<211> 17

30 -

<212> DNA -

<213> Artificial

35

<400> 46

40 tcgttgccgt cgggggg 17

<210> 47

<211> 18

45 <212> DNA

1030020

<213> Artificial

5

<400> 47

tcgttgccgt cggggggg

18

10 <210> 48

<211> 19

<212> DNA

15

<213> Artificial

20 <400> 48

tcgttgccgt cggggggg

19

25 <210> 49

<211> 20

<212> DNA

30 <213> Artificial

35 <400> 49

tcgttgccgt cggggggg

20

<210> 50

40 <211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

45

1030020

5	<400> 50 tcgaggacaa gattctcgt	19
10	<210> 51 <211> 14 <212> DNA <213> Artificial	
15	<400> 51 tcccgtgga cggt	14
20	<210> 52 <211> 27 <212> DNA <213> Artificial	
30	<400> 52 tcggcacgcg acgtgctggc cgtcgtt	27
35	<210> 53 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial	
40		
45	<400> 53	

	1030020	
	tcgtcgcgcc gtcacggggg g	21
	<210> 54	
5	<211> 19	
	<212> DNA	
10	<213> Artificial	
	<400> 54	
15	tcgtgtgcgt gccgttggg	19
	<210> 55	
20	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
25		
	<400> 55	
	tcgtcgccgt tgggcggg	18
30	--	
	<210> 56	
	<211> 21	
35	<212> DNA	
	<213> Artificial	
40		
	<400> 56	
	tcgtcgacgt cgttgggcgg g	21
45		

1030020
 <210> 57
 <211> 26
 5 <212> DNA
 <213> Artificial
 10
 <400> 57
 tcgcagttgt cgtaacgttg ggcggg 26
 15 <210> 58
 <211> 23
 <212> DNA
 20 <213> Artificial
 25 <400> 58
 ttaccggtta acgttgccg gcc 23
 <210> 59
 30 --
 <211> 23
 --
 <212> DNA
 35 <213> Artificial
 <400> 59
 40 accggttaac gttgtccccg ggg 23
 <210> 60
 45 <211> 16

1030020

<212> DNA

<213> Artificial

5

<400> 60

tcgtcgttgg tatgtt

10

16

<210> 61

<211> 20

15

<212> DNA

<213> Artificial

20

<400> 61

tcgtcgtcgt cgttgcgtt

25

20

<210> 62

<211> 24

30

<212> DNA

<213> Artificial

35

<400> 62

tcgtcgtcgt cgttgcgtt gggg

24

40

<210> 63

<211> 15

<212> DNA

45

1030020

<213> Artificial

5 <400> 63

tcgttcgggg tgccg

15

10 <210> 64

<211> 18

<212> DNA

15 <213> Artificial

20 <400> 64
tcgttcgggg taacgatt

18

<210> 65

25 <211> 17

<212> DNA

30 <213> Artificial

<400> 65
tcgttcgggg taacgatt

17

35

<210> 66

40 <211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

45

1030020

<400> 66

tcgttcgggg taccgat

17

5

<210> 67

<211> 21

10 <212> DNA

<213> Artificial

15

<400> 67

tcgttcgggg taccgatggg g

21

20 <210> 68

<211> 24

<212> DNA

25

<213> Artificial

30 <400> 68

tcgttcgct cccatgccgg gggg

24

<210> 69

35

<211> 20

<212> DNA

40 <213> Artificial

<400> 69

45 tcgtcgtttc gtcgttgggg

20

1030020

<210> 70

5 <211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

10

<400> 70

tcgttgtcgt ttcgctgccg gcggggg

27

15

<210> 71

<211> 24

20

<212> DNA

<213> Artificial

25

<400> 71

cgttgacgat cgtcccatgg cggg

24

30

<210> 72

<211> 16

35 <212> DNA

<213> Artificial

40

<400> 72

tctgcggcct tcgtcg

16

45 <210> 73

1030020

<211> 22

<212> DNA

5

<213> Artificial

10 <400> 73

tagtaaccgg tccggcgccc cc

22

<210> 74

15

<211> 19

<212> DNA

20 <213> Artificial

<400> 74

25 ttgcagcgct gccggtggg

19

<210> 75

30 <211> 23

-

<212> DNA

<213> Artificial

35

<400> 75

tcgtacggcc gccgtacggc ggg

23

40

<210> 76

<211> 21

45

1030020
 <212> DNA

<213> Artificial

5

<400> 76
 cggcccatcg agggcgacgg c 21

10

<210> 77

<211> 23

15 <212> DNA

<213> Artificial

20

<400> 77
 tcgctcgac tcccctcgag ggg 23

25 <210> 78

<211> 24

<212> DNA

30

<213> Artificial

35 <400> 78
 tcgtcgatga ctcgtggatg gggg 24

<210> 79

40 <211> 20

<212> DNA

45 <213> Artificial

<400> 79
5 tcgggcgccc gatcgggggg 20

<210> 80

10 <211> 19

<212> DNA

<213> Artificial
15

<400> 80
20 tcgtcgtct ttcgaaatt 19

<210> 81

<211> 18
25

<212> DNA

<213> Artificial

30

<400> 81
tcgtgacgtc ctcgagtt 18

35

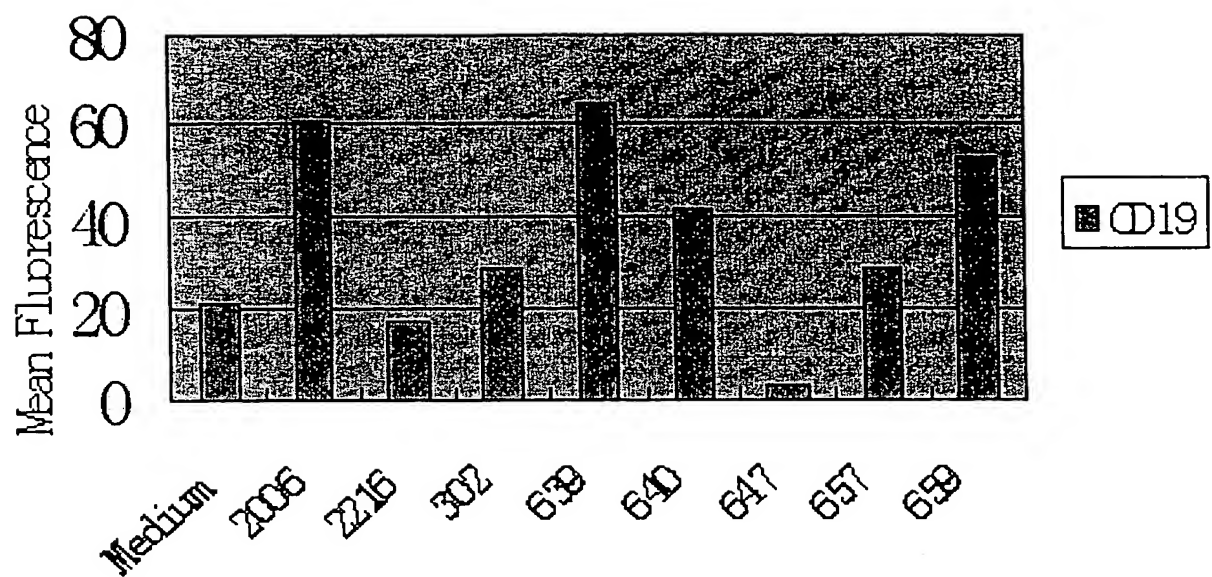


图 1

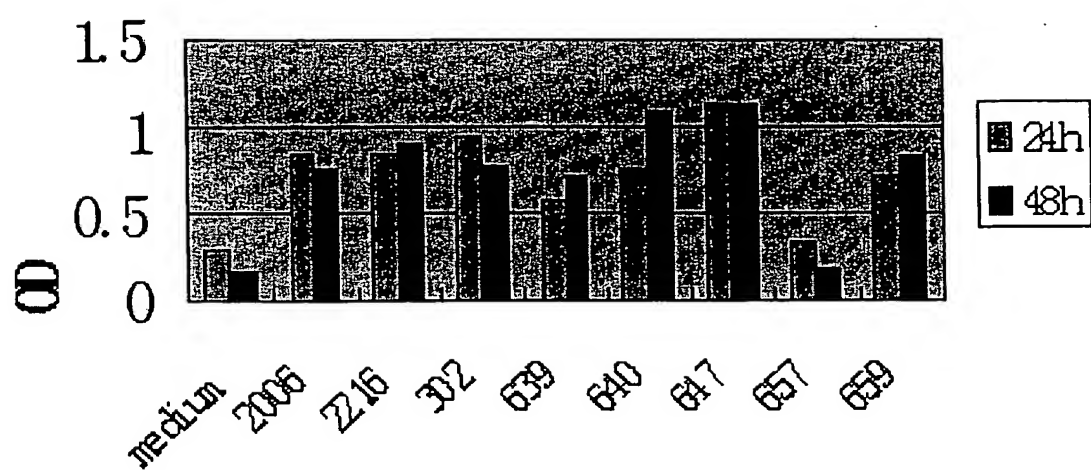


图 2

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.